

Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS STIMULA-
TIONSVERMÖGEN DER LYMPHOZYTEN VON
PATIENTEN MIT CHRONISCHER LYMPHATI-
SCHER LEUKÄMIE IN DER GEMISCHTEN
LEUKOZYTENKULTUR**

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eberhard Jenckel
Neumünster

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548401_0083

Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS STIMULATIONSVERMÖGEN DER LYMPHOZYTEN
VON PATIENTEN MIT CHRONISCHER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE IN DER
GEMISCHTEN LEUKOZYTENKULTUR



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eberhard Jenckel
Neumünster

Referent: Prof. Dr. med. H. Brücher

Korreferent: Prof. Dr. med. I. Boll



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17. 4. 1978

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	4
2 Material und Methoden	12
1 Patientengut	12
2 Herstellung von Lymphozytenanreicherungen	13
3 Anfertigen von E-Rosetten	13
4 Herstellung des Albumindichtegradienten	14
5 Vitalitätstest	14
6 Kulturanatz	15
3 Ergebnisse	17
1 Prozentsatz von E-Rosetten bei CLL-Patienten	17
2 Lymphozytenstimulation durch PHA	18
3 Auftrennung von Lymphozytenanreicherungen in verschiedene Dichteklassen	19
4 Lymphozytenstimulation durch PHA in den verschiedenen Dichteklassen	23
5 Reaktions- und Stimulationsfähigkeit der verschiedenen Dichteklassen in der MLC	25
6 Stimulationsfähigkeit gepoolter Lymphozyten von CLL-Patienten in der MLC	29
4 Diskussion	31
5 Zusammenfassung	37
6 Literaturverzeichnis	39

1 Einleitung

Die Untersuchungen J.F.A.P. Millers an neonatal thymektomierten Mäusen haben die entscheidenden Grundlagen für das heute gültige Modell des Immunsystems geliefert (28). Die Ergebnisse seiner Versuche haben gezeigt, daß die vollständige Entfernung des Thymus einer Maus in den ersten Lebenstagen eine deutliche Einschränkung der Immunantwort zur Folge hat. Die Gesamtlymphozytenzahl im Blut nimmt ab, und periphere lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten atrophieren. Die Fähigkeit, Homotransplantate abzustößen oder eine Hypersensibilitätsreaktion vom Spättyp zu entfalten, ist wesentlich stärker eingeschränkt, als das Vermögen, Antikörper herzustellen.

Ein ähnlicher Immundefekt ist bei Kindern mit Thymusaplasie (Di-George Syndrom) gefunden worden. Diese Beobachtungen hat R. A. Good als Hinweis für die zentrale Rolle des Thymus bei der Entwicklung des Immunsystems erkannt (9).

Eine Thymektomie zu einem späteren Zeitpunkt als in den ersten Lebenswochen führt, als alleinige Maßnahme, bei den meisten Versuchstieren zu keinem nachweisbaren Immundefekt (21).

Es gilt heute als gesichert, daß der Thymus vor und noch teilweise kurz nach der Geburt das Entwicklungsorgan für immunkompetente Zellen darstellt, die für die Abstoßung von Transplantaten und andere sogenannte zelluläre Immunreaktionen verantwortlich sind. Eine Störung des Thymus während dieser frühen Entwicklungsphase wirkt sich in einer später feststellbaren Funktionseinschränkung dieser zellulären Immunität aus (13).

Die Entwicklung der humoralen Immunität, d.h. der Fähigkeit, auf antigenen Reiz mit der Produktion von spezifischen Antikörpern zu reagieren, ist dagegen nicht unmittelbar an das Vorhandensein eines funktionsfähigen Thymus gebunden. Dieses läßt sich besonders deutlich durch Untersuchungen des Immunsystems der Vögel zeigen. Vögel besitzen neben dem Thymus ein

weiteres zentrales lymphatisches Organ, die Bursa Fabricii. Wird dieses Organ sofort nach dem Schlüpfen entfernt, so ist nicht die zelluläre Immunität betroffen, sondern vielmehr die Bildung von Antikörpern (56).

Durch Vergleich der Auswirkungen von neonataler Bursektomie und Thymektomie auf die Immunantwort ist bei Vögeln die Unterscheidung gelungen zwischen der Bursa als dem primären Bildungsort von Zellen, die auf antigenen Reiz mit Antikörperbildung reagieren, und dem Thymus als dem Entwicklungsorgan von Zellen, die die Abstoßung von Transplantaten und andere zelluläre Abwehrreaktionen besorgen (10).

Vorläufer von antikörperproduzierenden Zellen lassen sich bei Säugern am frühesten in der foetalen Leber nachweisen. Ein der Bursa entsprechendes einheitliches lymphatisches Organ hat man bei Säugern nicht finden können (1). Dennoch bezeichnet man auch bei Säugern die Vorläufer von antikörperproduzierenden Zellen als B-Lymphozyten (B für bursa-derived) im Gegensatz zu den Vorläufern von Effektorzellen der zellulären Immunabwehr, die T-Lymphozyten genannt werden (T für thymus-derived). Während der Entwicklung im Thymus geht der größte Teil der dort gebildeten Zellen rasch zugrunde. Gleiches gilt für die Bursa der Vögel und wahrscheinlich auch für entsprechende Strukturen bei den Säugern. Nur ein kleiner Teil der Zellen reift zu immunkompetenten Lymphozyten aus und wandert in die peripheren lymphatischen Organe bzw. rezirkuliert zwischen Blut und lymphatischem Gewebe (17, 20). Die Ansiedlung in den peripheren lymphatischen Organen geschieht in bestimmten Regionen, die als thymusabhängige bzw. thymusunabhängige Gebiete bezeichnet werden. Diese Unterscheidung basiert auf histologischen Untersuchungsergebnissen an peripheren lymphatischen Organen von tierexperimentell erzeugten oder angeborenen Immundefekten. Je nachdem, ob dabei die zelluläre oder humorale Immunität betroffen ist, findet sich eine Atrophie unterschiedlicher Regionen in Milz und Lymphknoten.

Die T-Lymphozyten sind im Rahmen der zellulären Immunität vor allem verantwortlich für die Allergie vom Spättyp, die Begrenzung des Tumorstwachstums und die Graft-versus-Host Reaktion (22). Die T-Lymphozyten antworten auf Antigenstimulierung mit einer klonalen Proliferation unter Freisetzung bestimmter Wirksubstanzen, wie z. B. dem Migrations-Hemm-Faktor, der die Wanderung von Makrophagen unterdrückt, oder chemotaktischen und zytotoxischen Faktoren (12). Diese Substanzen werden als Mediatoren der zellulären Immunantwort angesehen und vermögen alle in einer Immunreaktion beteiligten Zellen zu aktivieren. Nach jedem antigenen Reiz bleibt jeweils ein Teil der reagierenden Lymphozyten als Gedächtniszellen zurück, welche in der Lage sind, bei einem zweiten Kontakt mit dem gleichen Antigen eine schnelle Immunreaktion auszulösen (29).

Die B-Lymphozyten gelten als Träger der humoralen Immunität, die ihre Aufgabe in der Abwehr von bakteriellen Infekten haben und für die Allergie vom Soforttyp verantwortlich sind. Auch ein Teil der B-Zellen wandelt sich nach Antigenexposition in Gedächtniszellen um (30).

Eine Unterscheidung von T- und B-Lymphozyten ist lichtmikroskopisch bei den üblichen Färbungen für Blutaussstriche nach Pappenheim oder Wright nicht möglich, jedoch gelingt sie durch den Nachweis von unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften.

So hat man bei der Maus bestimmte Differenzierungsantigene für T-Zellen auf der Zellmembran gefunden, das Theta-Alloantigen (37), das Thymus-Leukämie-Antigen (8) und das mäuse-spezifische Lymphozyten-Antigen (49).

Ähnliche mäuse-spezifische Antigene gibt es auch für B-Zellen. Besonders charakteristisch aber ist für B-Zellen die dichte Besetzung der Zellmembran mit Immunglobulinen, von denen sich mit fluoreszenzoptischen und autoradiographischen Methoden nachweisen läßt, daß sie von den Zellen selbst synthetisiert werden (36, 34).

Diese Tatsache hat sich auch für menschliche B-Lymphozyten bestätigen lassen (57). Für menschliche T-Zellen ist die Fähigkeit, spontan Rosetten mit unvorbehandelten Schaferythrozyten zu bilden, besonders kennzeichnend (18).

Andere Möglichkeiten der Unterscheidung sind durch Funktionsteste gegeben, so etwa durch den 1960 von Nowell eingeführten Lymphozytentransformationstest unter Verwendung von Phytohaemagglutinin (PHA), bei dem sich ein Großteil der Lymphozyten in vitro unter geeigneten Kulturbedingungen in Blasten umwandelt und teilt (31).

In PHA-Kulturen werden fast ausschließlich T-Lymphozyten aktiviert, so daß die Stimulationsrate als Maß für den Anteil funktionsfähiger T-Lymphozyten im Kulturansatz angesehen werden kann (14, 19).

In späteren Jahren hat man zahlreiche andere Substanzen entdeckt, die ebenfalls einen hohen Prozentsatz von Lymphozyten in Kultur zur Transformation in Blasten anregen können, wie z. B. Concanavalin A, Metallionen, Pokeweed-Mitogen, Antilymphozyten- und Antiimmunglobulinseren (32). Man kann diese Mitogene auch als unspezifische Stimulantien bezeichnen, weil sie in der Lage sind, nicht sensibilisierte Lymphozyten, also auch vom Feten, zu stimulieren. Antigene hingegen führen nur bei Lymphozyten von sensibilisierten Individuen zu einer nachweisbaren Blastentransformation in vitro, z. B. im Falle von PPD (purified protein derivate) nur bei solchen von tuberkulinpositiven Spendern. Die Lymphozytentransformation in vitro durch ein Antigen gilt deshalb als spezifische Reaktion.

Einen Sonderfall einer Lymphozytentransformation in vitro durch Antigene stellt die sogenannte gemischte Leukozytenkultur, abgekürzt MLC (für mixed leukocyte culture), dar. Als erste hat Bain beobachtet, daß in einer Kultur von Leukozyten zweier

nicht verwandter Individuen nach 5 bis 7 Tagen Dauer Blasten erscheinen (5). Dies geschieht, ohne daß die Leukozytenspender durch gegenseitige Transplantation oder Transfusion zuvor sensibilisiert worden sind, tritt jedoch nicht ein, wenn Leukozyten von eineiigen Zwillingen oder genetisch identischen Tieren von Inzuchtstämmen verwendet werden. Die gemischte Leukozytenkultur gilt als In-vitro-Korrelat der in vivo einer Transplantatabstoßung vorausgehenden Proliferation antigenspezifischer Lymphozyten und wird in der Transplantationspraxis als Maßstab für die Differenz im Gewebsantigenmuster zwischen Testpartnern betrachtet.

Die die Stimulation in der gemischten Leukozytenkultur auslösenden Antigene sind nicht identisch mit den serologisch nachweisbaren Gewebsantigenen, also beim Menschen nicht mit den von den ABC-Loci des sogenannten HLA (human leukocyte antigen) -Systems gesteuerten Antigenen (15). Dies ist erkennbar an der Tatsache, daß Leukozyten von HLA-identischen, aber nicht verwandten Personen sich im allgemeinen in der gemischten Leukozytenkultur stimulieren (25). Nur bei Geschwistern oder Eltern und ihren Kindern findet sich eine Identität hinsichtlich der für die gemischte Leukozytenkultur maßgeblichen Antigene in einem höheren Prozentsatz. Es wird vermutet, daß der Genort, von dem aus die in der gemischten Leukozytenkultur stimulierenden Antigene gesteuert werden, eng benachbart zum Haupt-histokompatibilitäts-genort liegt (58).

Durch Bestrahlung oder Vorbehandlung mit Mitomycin läßt sich die Proliferationsfähigkeit von Leukozyten völlig hemmen, ohne daß deren Fähigkeit gemindert wird, fremde Leukozyten in der MLC zu stimulieren. Auf solche Weise läßt sich eine einseitig gerichtete Form der MLC durchführen, die nicht nur geeignet ist, die Reaktionsfähigkeit zweier Leukozytensuspensionen auf die Unterschiede im Gewebsantigenmuster festzustellen, sondern mit deren Hilfe es auch gelingt, in getrennten Ansätzen die

Stimulationsfähigkeit beider Leukozytensuspensionen zu bestimmen. Es besteht Einigkeit darüber, daß die Zellen, die in vitro durch fremde MLC-Antigene stimuliert werden, überwiegend T-Lymphozyten sind (16). Unterschiedlich wird hingegen die Frage beantwortet, welche Zellart der entscheidende Übermittler des antigenen Reizes in der MLC ist.

Während einzelne Berichte angeben, daß eine optimale Stimulation in der MLC nur unter Mitwirkung von T-Lymphozyten erzielt werden kann (27), tendiert die Ansicht der meisten Untersucher dahin, daß B-Lymphozyten zumindest gleiches Stimulationsvermögen besitzen wie T-Lymphozyten (52, 55, 3) oder sogar die entscheidenden Stimulatorzellen in der MLC darstellen (26, 35).

Dafür, daß B-Lymphozyten auch beim Menschen als Stimulatorzellen in der MLC wirksam sein können, mag unter anderem die Beobachtung sprechen, daß Lymphozyten von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) eine weitgehend erhaltene Stimulationsfähigkeit in der MLC besitzen (50, 43, 24).

Die CLL ist eine maligne Erkrankung des höheren Lebensalter, bei der es in einem oft langjährigen Verlauf zu einer zunehmenden Infiltration des gesamten lymphoretikulären Gewebes sowie zu einer Überschwemmung des Blutes mit einer einheitlichen Zellpopulation kommt, welche in der Regel charakteristische Merkmale von B-Lymphozyten aufweist (57). In fortgeschrittenen Fällen überwiegen die leukämischen B-Lymphozyten zahlenmäßig so sehr, daß bei In-vitro-Untersuchungen mit Blutlymphozyten kaum mehr eine Proliferation auf antigenen oder mitogenen Reiz festzustellen ist (23, 39, 6). Andererseits sind Lymphozyten von solchen Patienten in der Lage, normale Leukozyten in der MLC zu stimulieren, und zwar in einem Maße, welches deutlich weniger reduziert ist, als ihre Proliferationsfähigkeit auf alloantigenen Reiz. Deshalb nimmt die Mehrzahl der Untersucher an, daß die leukämischen Lymphozyten bei der CLL die Fähigkeit besitzen, in der MLC zu stimulieren (50, 43, 24).

Zweifelloos handelt es sich bei diesen leukämischen Lymphozyten nicht um normale B-Lymphozyten, so daß ein Rückschluß von dem Verhalten der leukämischen Zellen in der MLC auf dasjenige von normalen B-Lymphozyten nicht ohne weiteres möglich ist. Vieles spricht dafür, daß bei diesen Zellen ein Block im Reifungsprozeß existiert (48). Deshalb und wegen der relativ geringen Malignität hat Dameshek das Krankheitsbild der CLL als Akkumulation immunologisch defekter Lymphozyten bezeichnet (11). Wahrscheinlich liegt der CLL in den meisten Fällen ein allgemeiner Defekt des B-Zellsystems zugrunde, da klinisch neben der monoklonalen Proliferation von pathologischen B-Lymphozyten häufig schon frühzeitig ein Antikörpermangelsyndrom (44) im Vordergrund steht und relativ häufig Paraproteinämien oder autoimmunbedingte hämolytische Anämien und Thrombozytopenien auftreten (42).

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Untersuchern haben Schweitzer und Mitarbeiter die Ansicht vertreten, daß der Defekt der leukämischen Lymphozyten von CLL-Patienten auch ihre Fähigkeit betrifft, als Stimulatorzellen in der MLC zu dienen, und daß das bei dieser Erkrankung gefundene Stimulationsvermögen in der MLC ausschließlich auf noch neben den leukämischen Lymphozyten vorhandene normale Lymphozyten zurückzuführen ist (46). Diese Ansicht stützt sich auf Untersuchungen, bei denen Lymphozyten von CLL-Patienten mit Hilfe eines Dichtegradienten in verschiedene Dichteklassen getrennt wurden. Die meisten Dichteklassen wiesen ein gegenüber der ungetrennten Population vermindertes Reaktions- und Stimulationsvermögen in der MLC auf, während ein kleiner Teil von Zellen sowohl eine stärkere Reaktion als auch eine bessere Stimulation zeigte. In dieser Dichteklasse waren nach Ansicht der Autoren normale Lymphozyten angereichert. Schweitzer und Mitarbeiter haben ihre Befunde nur als Einzelbeobachtung wiedergegeben. In der vorliegenden Arbeit ist versucht worden, durch gleichartige Untersuchungen an einer größeren Zahl von Patienten die Widersprüche zwischen den verschiedenen Mittei-

lungen aufzuklären und eine gültige Aussage über das Stimulationsvermögen von leukämischen Lymphozyten von CLL-Patienten in der MLC zu machen.

2 Material und Methoden

2 1 Patientengut

In den Hauptversuchen wurden 10 Patienten mit typischer chronischer lymphatischer Leukämie im Alter von 64 - 85 Jahren untersucht. Alle Patienten hatten zur Zeit der Diagnose eine deutliche Lymphozytose im Blut und eine lymphozytäre Infiltration des Knochenmarks. Die Lymphozytenzahl im Blut wurde aus der Gesamtzahl der Leukozyten und dem Prozentsatz der Lymphozyten im Differentialblutbild errechnet und betrug zwischen 14 000 und 350 000/mm³. Keiner der Patienten hatte in den letzten drei Monaten vor der Untersuchung eine anti-leukämische Therapie erhalten. Die meisten waren überhaupt noch nicht zytostatisch oder radiologisch behandelt worden.

Für einen Zusatzversuch wurden 11 weitere Patienten mit typischer chronisch lymphatischer Leukämie im Alter von 65 - 77 Jahren untersucht. Diese Patienten hatten alle eine Lymphozytenzahl im Blut von über 100 000/mm³ bis maximal 450 000/mm³. Auch diese Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine zytostatische oder radiologische Behandlung.

Als Kontrollpersonen dienten gesunde Blutspender im Alter von 22 bis 54 Jahren.

2 2 Herstellung der Lymphozytenanreicherungen

Die Lymphozytenanreicherungen werden nach der Methode von Böyum (7) hergestellt. Heparinisiertes Venenblut (10 IE/ml Liquemin^R - Roche) wurde mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 4 verdünnt. In 30 ml Zentrifugengläsern wurden dann 16 ml verdünntes Blut über 8 ml einer Ficoll-Isopaque-Lösung geschichtet und 40 Minuten lang bei 400 x g zentrifugiert. Die Ficoll-Isopaque-Lösung wurde nach folgendem Rezept angefertigt: 9,556 g Ficoll (Pharmacia, Schweden) auf 20 ml Isopaque (Nyegaard u. Co AS, Oslo, Norwegen) und 140,4 ml Aqua dest.. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen an der Grenzschicht abgehebert und nach zweimaligem Waschen in Hanks'scher Lösung (Biocult Lab., Glasgow, Schottland) in Eagle's Minimum Essential Medium (Eagle's MEM, Difco) aufgenommen. Dann wurden aus den Zellsuspensionen die Zellzahlen mit Hilfe eines elektronischen Teilchenzählers (Coulter Counter Modell S) bestimmt.

2 3 Anfertigen von E-Rosetten

Für die Herstellung und Auszählung von E-Rosetten wurde nach der Methode von Pang und Mitarbeitern verfahren (33). 1×10^6 Lymphozyten in 0,25 ml Eagle's MEM wurden mit 2×10^7 Schafer erythrozyten (weniger als 1 Woche alt) in 0,25 ml Hanks'scher Lösung gemischt und bei 37° C 5 Minuten lang inkubiert. Dann wurden die Zellen noch einmal für 5 Minuten bei 400 x g und 4° C zentrifugiert und anschließend 2 Stunden lang in Eiswasser gehalten. Nachdem der Überstand sorgfältig abpipettiert worden war, wurden die E-Rosetten mit 0,3 ml einer 0,8 %igen Glutaraldehydlösung fixiert. Um die Rosetten auszuzählen, wurden sie mit einem Tropfen Methylen Blau gefärbt und auf einen Objektträger gebracht. Zellen, die mehr als vier Schafer erythrozyten gebunden hatten, wurden als rosettenbildende Zellen gezählt.

2 4 Herstellung des Albumingradienten

Hierbei diente die Methode von Rieber als Grundlage (38). Eine 35 %ige sterile Rinderalbuminlösung (35 % BSA for Albumin Gradient B, Biotest) wurde mit Hilfe einer Elektrolytlösung (Electrolyt Solution E, Biotest) auf folgende Konzentrationen verdünnt: 32 %, 29 %, 26 %, 23 %, 20 %. In ein 15 x 110 mm großes Zentrifugenglas wurde zuerst die 35 %ige Lösung pipetiert und darüber der Reihe nach die 32 -, 29 -, 26 -, 23 - und 20 %ige Lösung geschichtet. 1×10^8 Lymphozyten, aufgenommen in 1 ml Eagle's MEM, wurden dann auf die oberste Schicht gegeben. Daraufhin wurden die gefüllten Gläser bei Raumtemperatur 30 Minuten lang bei $1700 \times g$ zentrifugiert und die Zellen, die sich als schmale Ringe an den Grenzschichten der einzelnen Konzentrationen abgesetzt hatten, mit Hilfe von Pasteur Pipetten abgehebert. Die obersten Schichten des Gradienten enthielten keine Zellen. An der Grenzschicht zwischen der 23 %igen und der 26 %igen Albuminlösung fanden sich einige wenige Zellen. Diese wurden als Dichteklasse 26 bezeichnet. An der nächst tieferen Grenzschicht ließen sich bereits mehr Zellen nachweisen (Dichteklasse 29). Die Hauptmasse der Zellen sammelte sich an den beiden nächst tieferen Grenzschichten (Dichteklasse 32 und 35). Ein geringer Teil sedimentierte bis zum Boden. Dieser wurde als Dichteklasse > 35 bezeichnet. Nach zweimaligem Waschen der erhaltenen Dichteklassen in Hanks'scher Lösung wurden die Zellen in Eagle's MEM aufgenommen.

Zellausstriche von den ungetrennten Lymphozyten und den nach der Gradiententrennung erhaltenen Dichteklassen wurden mit einer Zytozentrifuge (Shandon Scientific Co., England) angefertigt und nach Pappenheim gefärbt.

2 5 Vitalitätstest

Vitalitätsprüfungen wurden mit der von Turk beschriebenen Methode durchgeführt (54). Hierbei wurden die Zellen mit einer

0,1 %igen Trypanblau-Lösung 15 Minuten lang bei 37° C inkubiert. Der Prozentsatz blau gefärbter, d.h. nicht vitaler Zellen, wurde durch Auszählung von 100 Zellen in einer Zählkammer bestimmt.

2 6 Kulturansatz

Für die Kulturen wurden die Zellen in ein Medium aufgenommen, das aus Eagle's MEM mit 10 %igen hitzeinaktiviertem (30 Minuten bei 56° C) gepooltem Humanserum, L-Glutamin (2 m Mol/ml), Penicillin (100 IE/ml) und Streptomycin (100μ g/ml) bestand.

Sowohl für die PHA-Stimulation als auch für die MLC wurden Mikrotitrationsplatten (Microtitration Plates M 220-24 AR, Greiner) verwendet, deren Ansatzvertiefungen einen flachen Boden besaßen. In jede Vertiefung wurden 2×10^5 Zellen in 0,2 ml Medium gefüllt und immer jeweils vier gleiche Ansätze angefertigt. Für die PHA-Stimulation erhielten die Kulturen 1μ g/ml PHA (PHA-P, Difco). Dann wurden sie für 72 Stunden, in einzelnen Zusatzexperimenten auch für 144 Stunden, in einem mit Luft und 5 % CO_2 begasten Brutschrank bei 37° C inkubiert. Kontrollkulturen ohne Zusatz von PHA wurden in gleicher Weise behandelt.

Die gemischten Lymphozytenkulturen wurden ebenfalls in Form von Vierfachansätzen mit jeweils 2×10^5 Zellen in 0,2 ml Medium pro Vertiefung durchgeführt. Die Gesamtzahl der Zellen in jedem Ansatz setzt sich aus stimulierenden und reagierenden Zellen im Verhältnis von 1 : 1 zusammen. Die stimulierenden Zellen wurden zuvor mit Mitomycin (Mitomycin-C, Serva, Heidelberg) bei 37° C 30 Minuten lang inkubiert, und zwar in einem Verhältnis von 5μ g Mitomycin auf 1×10^6 Zellen in 1 ml Eagle's MEM. Anschließend wurde das Mitomycin durch dreimaliges Waschen entfernt. Die Kulturdauer für die MLC betrug 168 Stunden. Zur Kontrolle wurden die reagierenden Lymphozyten mit

mitomycinbehandelten autologen Lymphozyten (im Verhältnis von 1 : 1) inkubiert. In einem Zusatzversuch wurden die Lymphozyten von mehreren Personen gepoolt und nach Mitomycinbehandlung als stimulierende Zellen verwendet.

Als Parameter der Neusynthese von DNS und damit als Maß für die Stimulation der Lymphozyten wurde der ^3H -Thymidineinbau in die Zellen gemessen. Hierzu erhielten die Zellen 18 Stunden vor Ablauf der Kulturzeit $1\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin (^3H -TdR, spezifische Aktivität 2 Ci/mMol, Radiochemical Centre Amersham, England) pro Vertiefung. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe eines halbautomatischen Aufarbeitungsgerätes (Skatron Multiple Cell Culture Harvester, Skatron AB, Norwegen). Dieses Gerät ermöglichte es, die Zellen aus den Vertiefungen der Mikrokulturplatten auf getrennte Positionen eines Filterpapierstreifens aufzusaugen und gleichzeitig das nicht in DNS eingebaute ^3H -Thymidin durch Waschen mit Aqua dest. zu entfernen. Nach Trocknen wurden die einzelnen Abschnitte des Filterpapierstreifens mit den aufgesaugten Zellen in Probengläschen mit Szintillationsflüssigkeit überführt und die Radioaktivität in einem Tricarb-Szintillationsspektrometer (Packard, Modell 3380) gemessen.

Aus der Impulszahl pro Kultur und Minute (cpm) der Vierfachansätze wurde das arithmetische Mittel errechnet. Das Ergebnis der stimulierten Kulturen wurde jeweils mit dem der Kontrollkulturen verglichen und die Differenz zwischen beiden Ergebnissen als Δ cpm bezeichnet.

3 Ergebnisse

3 1 Prozentsatz von E-Rosetten bei CLL-Patienten

In Lymphozytenanreicherungen von zehn Patienten mit CLL wurde der Prozentsatz von Zellen bestimmt, die mit Schaferythrozyten spontan Rosetten bildeten. Mit der gleichen Methode untersuchte Lymphozytenanreicherungen von dreißig Normalpersonen enthielten im Mittel 60 % rosettenbildender Zellen. Dem gegenüber bildeten die Patientenlymphozyten maximal 12 % und in vielen Fällen weniger als 1 % E-Rosetten. Wie aus der Tabelle I zu erkennen ist, war der Prozentsatz rosettenbildender Zellen bei den Patienten mit hohen Lymphozytenzahlen im Blut besonders niedrig.

Tabelle I Beziehung zwischen Lymphozytenzahl im Blut und dem Anteil E-Rosetten bildender Zellen in Lymphozytenanreicherungen von zehn Patienten mit CLL

Patient	Alter	Geschlecht	Lymphozytenzahl pro mm ³ Blut	Prozentsatz E-Rosetten
H.E.	80	w	14 000	8 %
R.E.	64	w	18 000	15 %
K.L.	67	w	30 000	11 %
H.A.	74	w	36 000	9 %
W.O.	77	m	38 000	12 %
G.E.	65	w	50 000	2 %
M.I.	80	w	76 000	1 %
R.I.	71	m	150 000	< 1 %
D.E.	85	m	340 000	< 1 %
C.I.	70	m	350 000	< 1 %

3 2 Lymphozytenstimulation durch PHA

Lymphozytenanreicherungen von zehn Normalpersonen und zehn Patienten mit CLL wurden mit PHA stimuliert. Die optimalen Kulturbedingungen und die optimale Mitogenkonzentration waren bereits früher in diesem Labor ermittelt worden und wurden übernommen (43). Als Maß für die Stimulation wurde die Differenz zwischen dem ^3H -Thymidineinbau in PHA-Kulturen und dem ^3H -Thymidineinbau in Kontrollkulturen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II dargestellt. Die Lymphozyten von Normalpersonen waren bereits nach dreitägiger Kulturdauer maximal stimuliert. Nach sechstägiger Kulturdauer war keine signifikante Steigerung des Ergebnisses zu verzeichnen. Die Lymphozyten von CLL-Patienten wurden durch PHA wesentlich weniger stimuliert als die Lymphozyten von Normalpersonen. Das Maximum ihrer Reaktion lag deutlich später: Nach sechstägiger Kulturdauer war die Stimulation von CLL-Lymphozyten doppelt so hoch wie nach drei Tagen, aber noch deutlich niedriger als bei den Normalpersonen.

Tabelle II Lymphozytenstimulation durch PHA bei Normalpersonen und Patienten mit CLL nach drei- bzw. sechstägiger Kulturdauer. Angegeben ist das arithmetische Mittel und der mittlere Fehler des Mittelwertes der Ergebnisse (Δ cpm) von jeweils zehn Experimenten

Kulturdauer	Normal	CLL
72	36 551 $\pm$ 10 620	7 972 $\pm$ 8 664
144	38 042 $\pm$ 12 921	14 178 $\pm$ 10 356

3 3 Auftrennung von Lymphozytenanreicherungen in verschiedene Dichteklassen

Lymphozytenanreicherungen von Normalpersonen und Patienten mit CLL wurden durch Zentrifugation über einen diskontinuierlichen Albumingradienten in verschiedene Dichteklassen aufgetrennt. Durch die Zentrifugation und das anschließende Waschen der Zellen gingen weniger als 10 % der Zellen verloren. Von den wiedergewonnenen Zellen waren annähernd 90 % in vitalem Zustand.

Am Boden der Gläser (Dichteklasse >35) fanden sich etwas mehr tote Zellen als in den übrigen Dichteklassen. Hinsichtlich der prozentualen Verteilung der wiedergewonnenen Zellen auf die verschiedenen Dichteklassen bestand kein wesentlicher Unterschied zwischen den Lymphozyten von Normalpersonen und den von Patienten (Tabelle III).

Tabelle III Verteilung der Zellen auf die einzelnen Dichteklassen. Angegeben ist jeweils das arithmetische Mittel und in Klammern die Streubreite der Ergebnisse von fünf Experimenten mit Normalpersonen und acht Experimenten mit CLL-Patienten

Spender	Dichteklassen				
	20 - 26	29	32	35	>35
Normal	$< 1 \%$	2 %	22 %	67 %	9 %
		(1-4 %)	(10-60 %)	(26-78 %)	(3-13 %)
CLL	1 %	2 %	39 %	55 %	4 %
		(1-5 %)	(15-71 %)	(21-65 %)	(3-5 %)

Die obersten Schichten des Gradienten enthielten jeweils nur wenige Zellen. Die Dichteklasse 29 enthielt etwa 2 % der wiedergewonnenen Zellen. Die Mehrzahl der Zellen war an den nächst tieferen Grenzschichten (Dichteklasse 32 und 35) zu finden. Ein geringerer Prozentsatz von Zellen sank durch die unterste Schicht des Gradienten bis zum Boden der Zentrifugengläser (Dichteklasse >35).

Bei einer Normalperson und einem Patienten mit CLL wurden jeweils von der ungetrennten Lymphozytenanreicherung und den verschiedenen Dichteklassen Zytozentrifugenpräparate angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Die zelluläre Zusammensetzung ist in Tabelle IV wiedergegeben.

Tabelle IV Zelluläre Zusammensetzung der einzelnen Dichteklassen bei einer Normalperson und einem Patienten mit CLL (Patient H.A. mit einer Lymphozytenzahl im Blut von $36\ 000/\text{mm}^3$)

Spender	Zelltyp	ungetrennt	20-26	Dichteklassen			
				29	32	35	>35
Normal	Lymphozyten	85 %	36 %	78 %	90 %	81 %	71 %
	Monozyten	10 %	64 %	22 %	8 %	11 %	6 %
	Granulozyten	5 %	-	-	2 %	8 %	23 %
CLL	Lymphozyten	97 %	91 %	96 %	97 %	98 %	96 %
	Monozyten	2 %	9 %	4 %	3 %	1 %	-
	Granulozyten	1 %	-	-	-	1 %	4 %

Danach fand eine gewisse Anreicherung von Monozyten in der Dichteklasse 29 bzw. in noch höheren Schichten des Gradienten und von Granulozyten in der Dichteklasse 35 statt. Monozyten und Granulozyten waren jedoch auch in anderen Dichteklassen vertreten. Lymphozyten stellten den Hauptteil der Zellen in praktisch allen Dichteklassen. Eine unterschiedliche Verteilung von größeren bzw. kleineren Lymphozyten ließ sich nicht sicher erkennen.

Andererseits konnte durch Anlegen von Lymphozytenkulturen und Zugabe von ^3H -Thymidin zu den unstimulierten Zellen nachgewiesen werden, daß der Anteil von spontan DNS-synthetisierenden Zellen, d.h. Blasten, in der Dichteklasse 29 durchweg höher lag als in den übrigen Dichteklassen (Tabelle V).

Danach wurden also durch die Dichtegradientenzentrifugation Zellen mit einer wesentlich anderen Dichte als die Masse der Lymphozyten in den oberen und der untersten Schicht des Gradienten angereichert, eine scharfe Trennung der Zellen erfolgte jedoch nicht.

Der Prozentsatz rosettenbildender Zellen in der Dichteklasse 29 war bei den Lymphozyten von Normalpersonen im Mittel eher etwas niedriger, bei den Patientenlymphozyten eher etwas höher als in den übrigen Dichteklassen (Tabelle VI). Der Unterschied war jedoch weder bei den Lymphozyten von Normalpersonen noch bei denen von Patienten signifikant.

Tabelle V Spontaneinbau von ^3H -Thymidin in den einzelnen Dichteklassen nach drei- bzw. sechstägiger Kulturdauer. Angegeben ist jeweils das arithmetische Mittel und der mittlere Fehler des Mittelwertes der Ergebnisse (cpm) von fünf Experimenten mit Normalpersonen und acht Experimenten mit CLL-Patienten

Kulturdauer (Std.)	Spender	ungetrennt	Dichteklassen			
			29	32	35	> 35
72	Normal	374	2 136	621	613	282
		± 130	$\pm 1 458$	± 201	± 319	± 92
	CLL	116	1 357	267	171	154
		± 68	$\pm 1 310$	± 304	± 148	± 149
144	Normal	549	2 745	854	386	285
		± 282	$\pm 1 356$	± 474	± 148	± 111
	CLL	177	1 238	203	138	95
		± 93	$\pm 1 143$	± 128	± 50	± 38

Tabelle VI Prozentsatz von E-Rosetten in den einzelnen Dichteklassen. Angegeben ist jeweils das arithmetische Mittel und in Klammern die Streubreite der Ergebnisse von fünf Experimenten mit Normalpersonen und acht Experimenten mit CLL-Patienten

Spender	ungetrennt	Dichteklassen			
		29	32	35	>35
Normal	58 %	40 %	51 %	56 %	48 %
	(42-67 %)	(31-49 %)	(40-62 %)	(30-69 %)	(43-57 %)
CLL	6 %	7 %	2 %	3 %	3 %
	(0-12 %)	(0-21 %)	(0-5 %)	(0-10 %)	(0-11 %)

3 4 Lymphozytenstimulation durch PHA in den verschiedenen Dichteklassen

In verschiedene Dichteklassen aufgetrennte Lymphozytenanreicherungen von fünf Normalpersonen und acht Patienten mit CLL wurden mit PHA stimuliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII dargestellt. Bei den Lymphozyten von Normalpersonen reagierte die Dichteklasse 29 im Mittel schlechter auf PHA als die übrigen Dichteklassen. Bei den Patientenlymphozyten reagierte die Dichteklasse 29 durchweg besser, in mehreren Fällen sogar um ein Vielfaches besser auf PHA als die übrigen Dichteklassen.

Tabelle VII Lymphozytenstimulation durch PHA in den einzelnen Dichteklassen nach dreitägiger Kulturdauer. Angegeben sind die Einzelergebnisse (Δ cpm) von fünf Experimenten mit Normalpersonen und acht Experimenten mit CLL-Patienten

Spender	ungetrennt	Dichteklassen			
		29	32	35	>35
<u>Normal</u>					
1	16 582	7 803	13 480	13 861	10 788
2	42 308	10 687	45 660	35 308	41 011
3	42 347	15 153	37 787	29 818	39 207
4	32 646	26 090	21 999	29 944	27 501
5	59 546	14 146	31 525	39 408	44 199
Mittelwert	38 685	14 775	30 090	29 667	32 541
<u>CLL</u>					
H.E.	23 945	26 339	20 207	19 911	22 017
K.L.	2 958	11 896	5 203	3 777	3 834
H.A.	23 453	23 786	17 758	15 591	10 614
W.O.	7 378	7 919	8 208	9 291	8 322
G.E.	3 406	3 757	3 067	3 503	3 216
R.I.	1 493	3 342	1 232	1 243	1 556
D.E.	1 018	6 298	929	580	728
C.I.	1 587	2 769	1 284	829	829
Mittelwert	8 154	10 763	7 236	6 840	6 389

Die Ergebnisse der Experimente mit Patientenlymphozyten wurden in dieser Tabelle und in den folgenden Tabellen so aufgelistet, daß sie der Reihenfolge der Patienten in Tabelle I entsprechen. In der ersten Zeile stehen also die Ergebnisse von dem Patienten mit der niedrigsten Lymphozytenzahl im Blut, in der zweiten Zeile stehen die Ergebnisse von dem Patienten mit der nächst höheren Lymphozytenzahl im Blut usw..Es läßt sich auf diese Weise leicht erkennen, daß die Reaktionsfähigkeit der Patientenlymphozyten auf PHA um so stärker eingeschränkt ist, je höher die Lymphozytenzahl im Blut ist.

3 5 Reaktions- und Stimulationsfähigkeit der verschiedenen Dichteklassen in der MLC

In verschiedenen Dichteklassen aufgetrennte Lymphozytenanreicherungen von fünf Normalpersonen und zehn Patienten mit CLL wurden als reagierende oder - nach Mitomycinbehandlung - als stimulierende Zellen in der MLC verwendet. Im ersten Fall dienten ungetrennte mitomycinbehandelte Lymphozytenanreicherungen von Normalpersonen als stimulierende Zellen, im zweiten Fall dienten ungetrennte Lymphozytenanreicherungen von Normalpersonen als reagierende Zellen. Die Kulturbedingungen für die MLC wurden aus früheren Versuchen in diesem Labor übernommen (43).

Tabelle VIII zeigt die Ergebnisse der Experimente, in denen die verschiedenen Dichteklassen als reagierende Zellen in der MLC verwendet wurden. Die Lymphozyten von Normalpersonen reagierten sehr unterschiedlich in der MLC. Im Verhalten der verschiedenen Dichteklassen ergab sich kein einheitliches Bild.

Die Lymphozyten von CLL-Patienten reagierten im Mittel deutlich schwächer in der MLC als die Lymphozyten von Normalpersonen. Auch hier war in der Regel die Reaktion um so stärker eingeschränkt, je höher die Lymphozytenzahl im Blut der Patienten war. Die Zellen der Dichteklasse 29 reagierten in der

Mehrzahl der Fälle besser als die Zellen der übrigen Dichteklassen.

Tabelle IX zeigt die Ergebnisse der Experimente, in denen die verschiedenen Dichteklassen als stimulierende Zellen in der MLC verwendet wurden. Für das Verhalten der verschiedenen Dichteklassen von normalen Lymphozyten als stimulierende Zellen in der MLC gilt das gleiche wie für ihr Verhalten als reagierende Zellen. Die Einzelergebnisse zeigten große Unterschiede, und die Reaktion der einzelnen Dichteklassen ergab kein einheitliches Bild. Die Patientenlymphozyten stimulierten im Mittel schwächer in der MLC als die Lymphozyten von Normalpersonen, jedoch war ihr Stimulationsvermögen weniger eingeschränkt als ihre Fähigkeit zur Reaktion. Patientenlymphozyten, die kaum mehr eine Reaktion in der MLC zeigten, wiesen z.T. eine beträchtliche Fähigkeit zur Stimulation in der MLC auf. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Stimulationsvermögen der Patientenlymphozyten in der MLC und der Lymphozytenzahl im Blut der Patienten erkennen. Die Dichteklasse 29 der Patientenlymphozyten stimulierte im Mittel mehr als doppelt so stark als die übrigen Dichteklassen.

Tabelle VIII Verwendung der einzelnen Dichteklassen als reagierende Zellen in der MLC. Als stimulierende Zellen wurden ungetrennte Lymphozytenanreicherungen von Normalpersonen verwendet. Angegeben sind die Einzelergebnisse (Δ cpm) von fünf Experimenten mit Normalpersonen und zehn Experimenten mit CLL-Patienten als Spender der reagierenden Zellen

Spender der reagierenden Zellen	Dichteklassen				
	ungetrennt	29	32	35	>35
<u>Normal</u>					
1	4 078	8 194	4 455	48	1 723
2	25 667	26 694	28 664	17 764	19 821
3	12 590	9 124	17 471	10 171	11 602
4	9 279	16 663	9 494	7 408	8 578
5	1 971	202	1 011	1 916	2 411
Mittelwert	10 717	12 175	12 219	7 461	8 827
<u>CLL</u>					
H.E.	2 489	2 544	2 792	2 519	2 402
R.E.	9 423	9 685	5 273	4 938	3 869
K.L.	760	2 518	622	764	921
H.A.	2 872	2 825	2 145	2 241	2 519
W.O.	547	859	539	343	259
G.E.	878	1 165	1 382	1 082	958
M.I.	193	115	108	50	10
R.I.	617	900	837	606	437
D.E.	341	339	232	181	111
C.I.	331	433	228	251	250
Mittelwert	1 845	2 138	1 415	1 297	1 173

Tabelle IX Verwendung der einzelnen Dichteklassen als stimulierende Zellen in der MLC. Als reagierende Zellen wurden ungetrennte Lymphozytenanreicherungen von Normalpersonen verwendet. Angegeben sind die Einzelergebnisse (Δ cpm) von fünf Experimenten mit Normalpersonen und zehn Experimenten mit CLL-Patienten als Spender der stimulierenden Zellen

Spender der stimulierenden Zellen		Dichteklassen			
	ungetrennt	29	32	35	> 35
<u>Normal</u>					
1	3 126	416	1 354	1 317	3 680
2	19 223	11 615	21 356	18 460	19 476
3	14 743	26 927	13 580	10 482	12 126
4	3 177	2 439	1 483	2 759	2 381
5	22 837	25 854	22 349	12 542	11 594
Mittelwert	12 621	13 450	12 024	9 112	9 851
<u>CLL</u>					
H.E.	8 080	7 264	7 210	6 914	6 742
R.E.	1 899	4 013	1 939	17	1 056
K.L.	2 338	8 084	4 730	2 936	2 384
H.A.	2 834	3 816	1 306	99	430
W.O.	344	14 939	6 330	6 158	3 335
G.E.	138	10 780	2 053	270	2 947
M.I.	8 859	14 579	1 854	2 229	1 689
R.I.	2 243	5 349	1 732	2 902	3 522
D.E.	4 710	5 682	5 151	1 283	3 209
C.I.	1 856	2 307	2 547	1 201	2 107
Mittelwert	3 330	7 681	3 485	2 401	2 742

3 6 Stimulationsfähigkeit gepoolter Lymphozyten von CLL-Patienten in der MLC

In einem Zusatzexperiment wurden ungetrennte Lymphozytenanreicherungen von elf Patienten mit CLL gepoolt und nach Mitomycinbehandlung als stimulierende Zellen in der MLC verwendet. Alle elf Patienten hatten ein Lymphozytose von über 100 000 Zellen pro mm³ im Blut. Diese hohe Lymphozytenzahl im Blut der Patienten kann als Gewähr dafür angesehen werden, daß dieser Pool von stimulierenden Zellen zu mehr als 90 % aus leukämischen Lymphozyten bestand. Zum Vergleich wurden ungetrennte Lymphozytenanreicherungen von elf Normalpersonen gepoolt und nach Mitomycinbehandlung als stimulierende Zellen in der MLC verwendet. Als dritte Sorte von stimulierenden Zellen wurden mitomycinbehandelte Lymphozyten einer einzelnen Normalperson verwendet. Ungetrennte Lymphozytenanreicherungen von Normalpersonen dienten als reagierende Zellen.

Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Tabelle X dargestellt. Gepoolte Lymphozyten von elf Patienten mit CLL wiesen etwa 70 % des Stimulationsvermögens auf, welches ein Pool von Lymphozyten von ebenso vielen Normalpersonen besaß. Um zu testen, ob der Pool von Patientenlymphozyten normal reagierende Lymphozyten enthielt, wurden die gepoolten Patientenlymphozyten ohne Mitomycinbehandlung für sich sieben Tage lang inkubiert. Von dem in üblicher Weise am Ende der Kulturzeit zugegebenen ³H-Thymidin wurde praktisch nichts in die Zellen eingebaut. Zum Vergleich erreichte die bei gleichem Vorgehen in dem Lymphozytenpool von Normalpersonen eingebaute Radioaktivität 34 934 cpm. Dies entspricht praktisch dem Mittelwert in Tabelle X. Mitomycinbehandelte Lymphozyten einer einzelnen Normalperson stimulierten im Mittel nur halb so stark wie die gepoolten Lymphozyten von Normalpersonen.

Tabelle X Verwendung gepoolter ungetrennter Lymphozytenanreicherungen von elf Normalpersonen bzw. elf Patienten mit CLL als stimulierende Zellen in der MLC. Als reagierende Zellen wurden ungetrennte Lymphozytenanreicherungen von Normalpersonen verwendet. Zum Vergleich wurden die reagierenden Zellen auch mit der ungetrennten Lymphozytenanreicherung einer einzelnen Normalperson stimuliert. Angegeben sind die Einzelergebnisse (Δ cpm)

Spender der reagierenden Zellen	Spender der stimulierenden Zellen		
	CLL-Pool	NP-Pool	NP 11
1	36 140	38 351	21 783
2	9 269	37 674	13 075
3	3 554	15 158	6 008
4	22 241	30 006	7 091
5	36 851	47 560	30 640
6	20 494	33 075	21 769
7	19 040	34 767	18 970
8	28 926	55 607	19 796
9	47 840	45 568	17 208
10	37 279	38 802	17 424
11	17 513	19 778	-
Mittelwert	25 377	36 031	17 376

4 Diskussion

Bei Stimulation von normalen menschlichen Blutlymphozyten mit PHA erfolgt das Maximum der Reaktion nach drei- bis viertägiger Kulturdauer. Lymphozyten von CLL-Patienten zeigen dagegen eine verzögerte und abgeschwächte Reaktion auf PHA, die gewöhnlich erst nach siebentägiger Kulturdauer ihr Maximum erreicht (23). Dies ist zunächst als Hinweis dafür angesehen worden, daß die leukämischen Lymphozyten selbst durch PHA stimulierbar sind, daß sie allerdings im Vergleich zu normalen Lymphozyten verzögert reagieren (41).

In den letzten Jahren ist jedoch gezeigt worden, daß die leukämischen Lymphozyten bei der Mehrzahl der Patienten mit CLL Charakteristika von B-Zellen aufweisen (34, 57), daß PHA aber andererseits, zumindest in gelöster Form, ausschließlich T-Zellen stimuliert (19, 45). Es ist direkt nachgewiesen worden, daß die in PHA-stimulierten Kulturen von CLL-Lymphozyten auftretenden Blasten Charakteristika von T-Zellen, z.B. Fähigkeit zur spontanen Bindung von unbehandelten Schafserythrozyten, besitzen (51).

Es wird deshalb heute allgemein angenommen, daß die in Kulturen von CLL-Lymphozyten nach Zugabe von PHA meßbare DNS-Synthese bzw. Blastentransformation allein als Aktivierung normaler T-Zellen aufzufassen ist, und daß die leukämischen Lymphozyten selbst nicht auf das Mitogen reagieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Auffassung. Im Mittel reagierten die Patientenlymphozyten auf PHA nach dreitägiger Kulturdauer nur etwa ein Viertel so stark und nach sechstägiger Kulturdauer nur halb so stark wie die Lymphozyten von Normalpersonen.

Lymphozyten von Patienten mit sehr hohen Lymphozytenzahlen im Blut reagierten besonders schlecht. Bei den Lymphozyten von

diesen Patienten lag der Anteil E-rosettenbildender Zellen, sprich T-Zellen, unter einem Prozent. Bei extrem hohen Lymphozytenzahlen im Blut der Patienten war praktisch keine Stimulation der Lymphozyten durch PHA mehr nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die nicht zur leukämischen Zellpopulation gehörenden Lymphozyten von CLL-Patienten mit Hilfe eines diskontinuierlichen Albumindichtegradienten von den leukämischen Lymphozyten zu trennen. Die auf diese Weise erhaltenen verschiedenen Dichteklassen von Zellen wurden mit PHA stimuliert und das Ergebnis mit der Reaktion ungetrennter Lymphozyten auf PHA verglichen. Zur Kontrolle wurden Lymphozyten von Normalpersonen in verschiedene Dichteklassen aufgetrennt und mit PHA stimuliert.

Bei den Lymphozyten von Normalpersonen reagierte in vier von fünf Fällen die niedrigste Dichteklasse von Zellen schlechter auf PHA als die übrigen Dichteklassen. Zusätzliche Untersuchungen zeigten, daß in dieser Dichteklasse der Prozentsatz E-rosettenbildender Zellen niedriger, der Anteil Monozyten und spontan DNS-bildender Zellen dagegen höher war als in den übrigen Dichteklassen.

Von PHA ist bekannt, daß es Lymphozyten auch nach nahezu vollständiger Entfernung von Monozyten aus dem Versuchsansatz stimuliert, im Gegensatz zu anderen Mitogenen, wie z. B. Concanavalin A, oder Antigenen, deren stimulierende Wirkung auf Lymphozyten von der Anwesenheit einer größeren Anzahl von Monozyten abhängt (32). Eine Erhöhung der Monozytenzahl im Versuchsansatz über den normalen Anteil hinaus fördert deshalb nicht die Stimulation, sondern reduziert den Anteil der auf PHA reagierenden Zellen.

Bei den Patientenlymphozyten reagierte die niedrigste Dichteklasse durchweg besser auf PHA als die übrigen Zellen. Bei einzelnen Patienten mit niedriger Lymphozytenzahl im Blut

fand sich in dieser Dichteklasse eine Anreicherung von E-rosettenbildenden Zellen.

Die verschiedenen Dichteklassen von normalen Lymphozyten und Patientenlymphozyten wurden ferner auf ihr Reaktions- und Stimulationsvermögen in der MLC hin untersucht. Das Verhalten der verschiedenen Dichteklassen von normalen Lymphozyten war in den einzelnen Experimenten recht unterschiedlich. Im Mittel waren die Zellen der niedrigsten Dichteklasse sowohl als reagierende als auch als stimulierende Zellen in der MLC den übrigen Zellen überlegen.

Es gilt heute als gesichert, daß in der MLC in erster Linie T-Lymphozyten reagieren (45, 3, 35). Da auch auf PHA ausschließlich T-Lymphozyten reagieren, stellt sich die Frage, wie das unterschiedliche Verhalten der niedrigsten Dichteklasse von normalen Lymphozyten bei der PHA-Stimulation und in der MLC zu erklären ist. Diese Dichteklasse unterschied sich von den übrigen Dichteklassen, wie bereits erwähnt, unter anderem durch ein höheren Prozentsatz von Monozyten. Im Gegensatz zur PHA-Stimulation, die relativ unabhängig von Monozyten ist, erfordert die MLC die Anwesenheit eines beträchtlichen Anteils von Monozyten im Kulturansatz (2, 40). Es wird angenommen, daß die Monozyten in der MLC einerseits eine entscheidende Rolle bei der Antigenerkennung spielen (32), andererseits unspezifisch die Lebensfähigkeit bzw. Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten in Kultur verbessern (4). Die Anreicherung von Monozyten in der niedrigsten Dichteklasse der Lymphozyten von Normalpersonen führt also möglicherweise zu einer Verbesserung der Reaktionsbedingungen in der MLC.

Die Lymphozyten von Patienten mit CLL reagierten im Mittel sehr viel schwächer in der MLC als die Lymphozyten von Normalpersonen. Auch hierbei reagierten die Lymphozyten von den Patienten mit den höchsten Lymphozytenzahlen im Blut am schlechtesten.

Als Ursache für die verminderte Reaktion der Patientenlymphozyten in der MLC ist, wie im Falle der PHA-Stimulation, der Mangel an reaktionsfähigen T-Lymphozyten anzusehen. Von den verschiedenen Dichteklassen der Patientenlymphozyten reagierte in einzelnen Fällen die niedrigste Dichteklasse besser als die übrigen. Eine ausreichende Erklärung hierfür kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht gegeben werden.

Während es als gesichert gilt, daß die reagierenden Zellen in der MLC T-Lymphozyten sind, ist die Natur der stimulierenden Zellen noch umstritten. Versuche mit Ratten haben ergeben, daß die T-Zellen sowohl für die Stimulation als auch für die Reaktion in der MLC verantwortlich sind (27). Andere Tierexperimente haben zu dem Ergebnis geführt, daß der stärkste stimulierende Reiz durch B-Zellen ausgelöst wird (35). Das gleiche ist auch für menschliche B-Lymphozyten bestätigt worden (26). Jedoch ist auch in Tierversuchen und Experimenten mit menschlichen Lymphozyten eine ausreichende Stimulation durch Populationen erreicht worden, die kaum B-Zellen enthielten (55). Schließlich sind Makrophagen als besonders effektive Stimulatorzellen beschrieben worden (53).

In der vorliegenden Arbeit stimulierten die verschiedenen Dichteklassen von normalen Lymphozyten zum Teil unterschiedlich stark in der MLC. Jedoch wurde die stärkste Stimulation nicht immer von der gleichen Dichteklasse erzielt. Auch die niedrigste Dichteklasse mit ihrem erhöhten Anteil von Monozyten stimulierte nicht in jedem Fall besser als die übrigen Dichteklassen.

Als Hinweis darauf, daß B-Lymphozyten offenbar eine wirkungsvolle Stimulation in der MLC hervorrufen können, haben einige Autoren die Tatsache angeführt, daß die an pathologischen B-Zellen reichen Lymphozyten von Patienten mit CLL ein gutes Stimulationsvermögen zeigen (50, 43). Darüber hinaus ist sogar von einem überdurchschnittlichen Stimulationsvermögen von CLL-Lymphozyten in der MLC berichtet worden (24). Lediglich

Schweitzer und Mitarbeiter haben ein gegenüber normalen Lymphozyten vermindertes Stimulationsvermögen von CLL-Lymphozyten in der MLC gefunden (46).

In dieser Arbeit stimulierten die Patientenlymphozyten in der MLC im Mittel deutlich schlechter als die Lymphozyten von Normalpersonen. Allerdings war die Variabilität der Einzelergebnisse sowohl in den Experimenten mit Lymphozyten von Normalpersonen als auch in denen mit Patientenlymphozyten sehr groß. Wir versuchten deshalb, durch ein Zusatzexperiment eine genauere Aussage über das tatsächliche Stimulationsvermögen von Patientenlymphozyten in der MLC zu machen.

Um die Variabilität der Ergebnisse in der MLC einzuschränken, ist vorgeschlagen worden, als stimulierende Zellen gepoolte Zellen von verschiedenen Spendern zu verwenden (47). Entsprechend diesem Vorschlag wurde das Stimulationsvermögen von gepoolten Patientenlymphozyten und gepoolten Lymphozyten von Normalspendern verglichen. Die gepoolten Patientenlymphozyten wiesen dabei 70 % des Stimulationsvermögens von gepoolten Lymphozyten normaler Spender in der MLC auf.

Bei Verwendung der verschiedenen Dichteklassen von Patientenlymphozyten als stimulierende Zellen in der MLC zeigten die Zellen der niedrigsten Dichteklasse in der Mehrzahl der Versuche ein besseres Stimulationsvermögen als die übrigen Zellen. Ein gleiches Ergebnis bei ebenfalls deutlich eingeschränktem Stimulationsvermögen ungetrennter Patientenlymphozyten haben Schweitzer und Mitarbeiter in ihren Versuchen erhalten. Diese Autoren haben angenommen, daß in der niedrigsten Dichteklasse normale T-Lymphozyten angereichert würden, und daß diese ausschließlich für die Stimulation in der MLC verantwortlich seien.

Gegen diese Annahme sprechen zwei Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Erstens war die Einschränkung des Stimulationsvermögens

in der MLC nicht so deutlich von der Lymphozytenzahl im Blut der Patienten abhängig wie die Einschränkung der Reaktionsfähigkeit in der MLC bzw. gegen PHA. Zweitens wies ein Pool von Patientenlymphozyten, wie bereits erwähnt, gegenüber einem gleich großen Pool von Lymphozyten normaler Spender nur eine Einschränkung des Stimulationsvermögens von 30 % auf. Dieser Pool von Patientenlymphozyten war von Patienten mit extrem hohen Lymphozytenzahlen im Blut gewonnen worden und enthielt nur einen verschwindend kleinen Anteil normaler T-Lymphozyten. Diese Befunde sprechen dafür, daß die leukämischen Lymphozyten von CLL-Patienten in der Lage sind, fremde Lymphozyten in der MLC zu stimulieren, und daß das gefundene Stimulationsvermögen nicht allein auf den Rest von normalen Lymphozyten im Blut der Patienten zurückzuführen ist.

Für die Beobachtung, daß die Zellen der niedrigsten Dichteklasse von Patientenlymphozyten in der Mehrzahl der Versuche besser stimulierten als die übrigen Zellen, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen keine ausreichende Erklärung gegeben werden. Möglicherweise spielte eine geringe Anreicherung von Monozyten in dieser Dichteklasse eine Rolle.

Um die Bedeutung der Monozyten für das Stimulationsvermögen in der MLC abzuklären, sind jedoch nach den Erfahrungen der vorliegenden Arbeit geeignetere Methoden als die Dichtegradiententrennung erforderlich.

5 Zusammenfassung

Lymphozytenanreicherungen aus dem Blut von Patienten mit CLL wurden über einen diskontinuierlichen Albumindichtegradienten geschichtet und durch anschließende Zentrifugation in verschiedene Dichteklassen aufgetrennt. Das gleiche Verfahren wurde auf Lymphozytenanreicherungen aus dem Blut von Normalpersonen angewendet. Die verschiedenen Dichteklassen wurden auf ihre zelluläre Zusammensetzung hin untersucht sowie in vitro mit PHA stimuliert und als reagierende bzw. stimulierende Zellen in der MLC verwendet.

Die verschiedenen Dichteklassen von Patientenlymphozyten wiesen keine eindeutigen Unterschiede in ihrer zellulären Zusammensetzung auf. Bei den Lymphozyten von Normalpersonen fand sich eine Anreicherung von Monozyten in der niedrigsten Dichteklasse.

Die Reaktion von Patientenlymphozyten war gegenüber derjenigen von normalen Lymphozyten deutlich vermindert und verzögert. Das Reaktionsvermögen auf PHA war um so stärker eingeschränkt, je höher die Lymphozytenzahl im Blut der Patienten war. Die Zellen der niedrigsten Dichteklasse von Patientenlymphozyten reagierten etwas besser auf PHA als die übrigen Patientenlymphozyten.

Das Reaktionsvermögen von Patientenlymphozyten in der MLC war ebenfalls eingeschränkt, und zwar auch um so deutlicher, je höher die Lymphozytenzahl im Blut der Patienten war. Die Zellen der niedrigsten Dichteklasse reagierten stärker als die übrigen Patientenlymphozyten.

Das Stimulationsvermögen von Patientenlymphozyten war gegenüber demjenigen von normalen Lymphozyten eingeschränkt, jedoch nicht so stark wie das Reaktionsvermögen. Eine eindeutige

Beziehung zwischen der Einschränkung des Stimulationsvermögens in der MLC und der Lymphozytenzahl im Blut der Patienten war nicht zu erkennen. Die niedrigste Dichteklasse von Patientenlymphozyten rief eine stärkere Stimulation in der MLC hervor als die übrigen Patientenlymphozyten.

In einem Zusatzexperiment wurden Lymphozyten von verschiedenen Patienten mit CLL gepoolt und mit einem gleich großen Pool von Lymphozyten normaler Spender hinsichtlich ihres Stimulationsvermögens in der MLC verglichen. Die Patientenlymphozyten wiesen dabei 70 % des Stimulationsvermögens von normalen Lymphozyten auf.

6 Literaturverzeichnis

1. ABDOU, N. I. and Abdou, N. L.:
Bone marrow: The bursa equivalent in man?
Science 175, 446 (1972)
2. ALTER, B. J., Bach, F. H.:
Lymphocyte reactivity in vitro. I. Cellular reconstitution of purified lymphocyte response.
Cell. Immunol. 1, 207 (1970)
3. ANDERSSON, J., Nordling, S. and Häyry, P.:
Proliferation of B and T cells in mixed lymphocyte cultures.
J. exp. Med. 138, 324 (1973)
4. BACH, F. H., Alter, B. J., Solliday, S., Zoschke, D. C. and Janis, M.:
Lymphocyte reactivity in vitro. II. Soluble reconstitution factor permitting response of purified lymphocytes.
Cell. Immunol. 1, 219 (1970)
5. BAIN, B., Vas, M. R. and Lowenstein, L.:
The development of large immature mononuclear cells in mixed leukocyte cultures.
Blood 23, 108 (1964)
6. BERNARD, C., Geraldès, A. and Boiron, M.:
Effects of phytohemagglutinin on blood cultures of chronic lymphocytic leukemias.
Lancet i, 667 (1964)
7. BÖYUM, A.:
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 21, 1 (1968)

8. BOYSE, E. A. and Old, L. J.:
Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics.
Ann. Rev. Genet. 3, 269 (1969)
9. COOPER, M. D., Perey, D. Y., Peterson, R. D. A.,
Gabrielsen, A. E. and Good, R. A.:
The two component concept of the lymphoid system.
In: Immunologic Deficiency Diseases in Man. Edited by Bergsma,
D., Good, R. A.
New York, National Foundation Press, 7 (1968)
10. COOPER, M. D., Peterson, R. D. A., South, M. A. and
Good, R. A.:
The functions of the thymus system and the bursa system
in the chicken.
J. exp. Med. 123, 75 (1966 b)
11. DAMESHEK, W.:
Chronic lymphocytic leukemia - an accumulative disease of
immunologically incompetent lymphocytes.
Blood 29, 566 (1967)
12. DAVID, J. R.:
Lymphocyte mediators and cellular hypersensitivity.
New Engl. J. Med. 288, 143 (1973)
13. DI GEORGE, A. M.:
Congenital absence of the thymus and its immunologic
consequences: Concurrence with congenital hypoparathyreodism.
In: Immunologic Deficiency Diseases in Man. Edited by
Bergsma, D., Good, R. A., Finstad, J., Miescher, O. A.,
Smith, R. T.
New York, National Foundation Press, 116 (1968)

14. DUKOR, P. and Dietrich, F. M.:
Impairment of phytohemagglutinin- induced blastic transformation in lymph nodes from thymectomized mice.
Int. Arch. Allergy 32, 521 (1967)
15. EIJSVOOGEL, V. P., van Rood, J. J., Toit, E. D. and Schellekens, P. T. A.:
Position of a locus determining mixed lymphocyte reaction distinct from the known HL-A loci.
Eur. J. Immunol. 2, 413 (1972)
16. EIJSVOOGEL, V. P., Schellekens, P. T. A., Breur Vriesendorp, B., Koning, L., Koch, C., van Leeuwen, A. and van Rood, J. J.:
Mixed lymphocyte cultures and HL-A.
Transplant. Proc. 3, 85 (1971)
17. EVERETT, N. B., Caffrey, R. W. and Rieke, W. O.:
Recirculation of lymphocytes.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 113, 887 (1964)
18. FRÖLAND, S. S.:
Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A probable marker of T lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 1, 269 (1972)
19. GEHA, R. S., Rosen, F. C. and Merler, E.:
Unresponsiveness of human B lymphocytes to phytohaemagglutinin.
Nature 248, 426 (1974)
20. GOWANS, J. L. and Knight, E. J.:
The route of re-circulation of lymphocytes in the rat.
Proc. Roy. Soc. Ser. B 159, 257 (1964)

21. GOOD, R. A., Dalmasso, A. P., Martinez, C., Archer, O. K.,
Pierce, J. C. and Papermaster, B. W.:
The role of the thymus in development of immune capacity
in rabbits and mice.
J. exp. Med. 116, 733 (1962)

22. GREAVES, M. F., Owen, J. J. T., Raff, M. C.:
T and B lymphocytes. Origins, properties and role in
immune responses.
Excerpta Medica, Amsterdam (1973)

23. HAVEMANN, K. and Rubin, A. D.:
The delayed response of chronic lymphocytic leukemia
lymphocytes to phytohemagglutinin in vitro.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 127, 668 (1968)

24. KASAKURA, S.:
MLC stimulatory capacity and production of a blastogenic
factor in patients with chronic lymphatic leukemia and
Hodgkin's disease.
Blood 45, 823 (1975)

25. KISSMEYER - NIELSEN, F., Svejgaard, A., Sorensen, S. F.,
Nielsen, L. S. and Thorsby, E.:
Mixed lymphocytes cultures and HL-A identity in unrelated
subjects.
Nature 228, 63 (1970)

26. LOHRMANN, H., Novikovs, L. and Graw, R. G.:
Stimulatory capacity of human T and B lymphocytes in the
mixed lymphocyte culture.
Nature 250, 144 (1974)

27. MacLAURIN, B. P.:
Thymus origin of lymphocytes reacting and stimulating
reaction in mixed lymphocyte cultures.
Clin. exp. Immunol. 10, 649 (1972)
28. MILLER, J. F. A. P.:
Effect of neonatal thymectomy on the immunological
responsiveness of the mouse.
Proc. Roy. Soc. B 156, 415 (1962)
29. MILLER, J. F. A. P. and Mitchell, G. F.:
Thymus and antigen-reactive cells.
Transplant. Rev. 1, 3 (1969)
30. MITCHELL, G. F., Chan, E. L., Noble, M. S., Weissman, I. L.,
Mishell, R. I. and Herzenberg, L. A.:
Immunological memory in mice.
III. Memory to heterologous erythrocytes in both T cell
and B cell populations and requirement for T cells in
expression of B cell memory. Evidence using immunoglo-
bulin allotype and mouse alloantigen theta markers with
congenic mice.
J. exp. Med. 135, 165 (1972)
31. NOWELL, P. C.:
Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures
of normal human leukocytes.
Cancer Res. 20, 462 (1960)
32. OPPENHEIM, J. J. and Rosenstreich, D. L.:
Signals regulating in vitro activation of lymphocytes.
Prog. Allergy. 20, 65 (1976)

33. PANG, G. T. M., Baguley, D. M. and Wilson, J. D.:
Spontaneous rosettes as a T-lymphocyte marker: a modified method giving consistent results. SRBC rosettes.
J. immunol. Methods 4, 41 (1974)

34. PERNIS, B., Ferrarini, M., Forni, L., Amante, L.:
Immunoglobulins on lymphocyte membranes
In: Progress in Immunology, Edited by B. Amos
Academic Press, New York, 95 (1971 a)

35. PLATE, J. M. D. and McKenzie, J. F. C.:
B cell stimulation of allogeneic T cell proliferation
in mixed lymphocyte cultures.
Nature: New Biology 26, 247 (1973)

36. RABELLINO, E., Colon, S., Grey, H. M. and Unanue, E. R.:
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes.
I. Distribution and quantitation.
J. exp. Med. 133, 156 (1971)

37. RAFF, M. C.:
Theta isoantigen as a marker of thymus-derived lymphocytes
in mice.
Nature 224, 378 (1969)

38. RIEBER, E. P., Riethmüller, G. und Riethmüller, D.:
weitere Untersuchungen zur Auftrennung humaner Lymphozyten in verschiedene Dichteklassen und ihre Transformation in vitro.
In: Leukozytenkulturen, Hrsg. Brittinger, G., Roggenbach, J. J.
Schattauer Verlag, Stuttgart, 87 (1971)

39. ROBBINS, J. H. and Lewis, W. R.:
Inherent inability of chronic lymphocytic leukemia
lymphocytes to respond to phytohemagglutinin.
Int. Arch. Allergy 43, 845 (1972)
40. RODE, H. N. and Gordon, J.:
The mixed leukocyte culture: a three component system.
J. Immunol. 104, 1453 (1970)
41. RUBIN, A. D., Havemann, K. and Dameshek, W.:
Studies in chronic lymphocytic leukemia. Further studies
of the proliferative abnormality of the blood lymphocyte.
Blood 33, 313 (1969)
42. RUBIN, A. D. and Davis, S.:
The role of the lymphocyte in producing the clinical
manifestations of chronic lymphocytic leukemia.
Medical Clinics of North America 57, 463 (1973)
43. RÜHL, H., Vogt, W., Bo chert, G., Schmidt, S., Moelle, R.
and Schaoua, H.:
Mixed lymphocyte culture stimulatory and responding
capacity of lymphocytes from patients with lymphoprolif-
erative diseases.
Clin. exp. Immunol. 19, 989 (1974)
44. SCAMPS, R. A., Streeter, A. M. and O'Neill, B. J.:
Immunoglobulin levels in chronic lymphocytic leukaemia.
Med. J. Austr. 1, 535 (1971)
45. SCHWARZ, M. R., Tryler, R. W. and Everett, N. B.:
Mixed lymphocyte reaction: an in vitro /for anti-lymphocy-
tic serum activity.
Science 160, 1014 (1968)
/Test

46. SCHWEITZER, M., Melief, C. J. M. and Eijsvogel, V. P.:
The nature of the transforming lymphocyte in chronic
lymphocytic leukemia.
Eur. J. Immunol. 3, 121 (1973)
47. SEGALL, M. and Bach, F. H.:
Pooled stimulating cells as a "standard stimulator" in
mixed lymphocyte culture.
Transplantation 22, 79 (1976)
48. SELIGMANN, M., Preud'Homme, J. L. and Brouet, J. C.:
B and T cell markers in human proliferative blood diseases
and primary immunodeficiencies, with special reference
to membrane bound immunoglobulins.
Transplant. Rev. 16, 85 (1973)
49. SHIGENO, N., Hämmerling, U., Arpels, C., Boyse, E. A.
and Old, L. J.:
Preparation of lymphocyte specific antibody from anti-
lymphocyte serum.
Lancet ii, 320 (1968)
50. SMITH, M. J., Browne, E. and Slungaard, A.:
The impaired responsiveness of chronic lymphatic leuke-
mia lymphocytes to allogeneic lymphocytes.
Blood 41, 505 (1973 b)
51. Smith, J. L. and Haegert, D.:
B and T lymphocyte markers on transformed lymphocytes
from mitogen-stimulated cultures of normal and CLL
lymphocytes and on tonsil blasts.
Clin. exp. Immunol. 17, 547 (1974)

52. SONDEL, P. M., Chess, L. and Schlossman, S. F.:
Immunologic functions of isolated human lymphocyte
subpopulations.
IV. Stimulation of MLC and CML by human T cells.
Cell. Immunol. 18, 351 (1975)
53. TALMAGE, D. W. and Hemmingsen, H.:
Is the macrophage the stimulating cell?
J. Allergy Clin. Immunol. 55, 442 (1975)
54. TURK, A., Glade, P. R. and Chessin, L. N.:
Blast like transformation induced in peripheral blood
lymphocytes by cellular injury: a comparison of soni-
cation and phytohaemagglutinin.
Blood 33, 329 (1969)
55. VON BOEHMER, H.:
Separation of T and B lymphocytes and their role in the
mixed lymphocyte reaction.
J. Immunol. 112, 70 (1974)
56. WARNER, N. L., Szenberg, A. and Burnet, F. M.:
The immunological role of different lymphoid organs in
the chicken.
I. Dissociation of immunological responsiveness.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 40, 373 (1962)
57. WILSON, J. D. and Nossal, G. V. J.:
Identification of human T and B lymphocytes in normal
peripheral blood and in chronic lymphocytic leukaemia.
Lancet ii, 788 (1971)
58. YUNIS, E. J. and Amos, B. D.:
Three closely linked genetic systems relevant to trans-
plantation.
Proc. nat. Acad. Sci. 68, 3031 (1971)

Lebenslauf

Am 16. 12. 1948 wurde ich als Sohn des Facharztes Dr. Walter Jenckel und seiner Ehefrau Annemarie Jenckel, geborene Haberland, in Neumünster geboren.

Auf dem Gymnasium in Bad Bramstedt bestand ich am 16. 05. 1969 die Reifeprüfung. Dann folgte ein einjähriger Grundwehrdienst in einer Sanitätseinheit.

Zum Wintersemester 1970/71 begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium in der Fachrichtung Veterinärmedizin. Ein Jahr später erhielt ich die Zulassung für das Fach Humanmedizin an der gleichen Universität. Am 13. 03. 1973 bestand ich nach fünf Semestern Vorklinik das Physikum. Während des klinischen Studiums beschäftigte ich mich in der Hämatologischen Abteilung des Klinikum Steglitz mit Fragen der zellulären Immunität. Nach sechs klinischen Semestern beendete ich am 23. 08. 1976 das Studium mit der ärztlichen Staatsprüfung. Als Medizinalassistent war ich in der Inneren-, Chirurgischen- und Hals-Nasen- und Ohrenklinik des Klinikum Steglitz tätig.

